

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 28 SEP 2000

WIPO PCT



10 / 049404

DE 00/02589

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 199 37 264.0

Anmeldetag: 6. August 1999

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts, Heidelberg, Neckar/DEBezeichnung: F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte

IPC: C 07 K, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 6. September 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

Hoß



K 2619

### F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte, die eine Regression von Morbus Hodgkin induzieren können, für solche F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte kodierende DNAs sowie ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte und ihre Verwendung.

5

10

15

25

30

Natürliche Antikörper weisen vier variable Domänen, zwei V<sub>H</sub>- und zwei V<sub>L</sub>-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V<sub>H</sub>- und einer V<sub>L</sub>-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper weisen zwei gleiche Bindungsstellen auf, d.h. sie erkennen ein Antigen und werden daher auch als monospezifisch bezeichnet. Künstliche Antikörper können auch zwei verschiedene Bindungsstellen aufweisen, d.h. sie erkennen dann zwei Antigene und werden entsprechend als bispezifisch bezeichnet. Ein Beispiel solcher Antikörper ist jener, der den FcγIIIA Rezeptor (CD16) von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und das Oberflächenprotein CD30 von Morbus Hodgkin-Zellen erkennt. Mit diesem Antikörper (bimAbHRS-3/A9) können NK-Zellen aktiviert und gegen Morbus Hodgkin-Zellen ausgerichtet werden, wodurch eine Regression von Morbus Hodgkin induziert wird (vgl. Hartmann, F. et al., Blood 89 (1997), 2042). Andererseits hat sich gezeigt, daß bimAbHRS-3/A9 nur schwer herstellbar bzw. reinigungsfähig ist. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß bimAbHRS-3/A9 bei vielen Patienten unerwünschte Immunreaktionen hervorruft.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem eine Regression von Morbus Hodgkin induziert werden kann, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den

Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß ein F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt, das Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein aufweist, eine Regression von Morbus Hodgkin induzieren kann, wobei die Lyse der Tumorzellen stärker ist als mit bimAbHRS-3/A9. Ferner hat er erkannt, daß ein solches F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt in großen Mengen und hoher Reinheit hergestellt werden kann. Des Weiteren zeichnet sich das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen bei Patienten führen können.

15 Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein aufweist.

20 Der Ausdruck "F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt" weist auf ein Antikörper-Konstrukt hin, das variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist. Als variable Domänen liegen insbesondere Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein vor.

25 Der Ausdruck "Bindungsstelle" weist auf eine V<sub>H</sub>- und eine V<sub>L</sub>-Domäne hin, mittels derer das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt an einen CD16-Rezeptor bzw. ein CD30-Oberflächenprotein binden kann.

30 Der Ausdruck "CD16-Rezeptor" umfaßt einen CD16-Rezeptor jeglicher Art und Abstammung. Beispielsweise kann der CD16-Rezeptor von NK-Zellen, Makrophagen oder aktivierten Monocyten stammen. Auch kann der CD16-Rezeptor in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen, wobei letztere Form auch ein Fragment eines CD16-Rezeptors umfaßt, an das ein gegen einen CD16-Rezeptor gerichteter Antikörper binden kann.

35 Der Ausdruck "CD30-Rezeptor" umfaßt einen CD30-Rezeptor jeglicher Art und Abstammung. Beispielsweise kann der CD30-

Rezeptor von Morbus Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen stammen. Auch kann der CD30-Rezeptor in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen, wobei letztere Form auch ein Fragment eines CD30-Rezeptors umfaßt, an das ein gegen einen CD30-Rezeptor gerichteter Antikörper binden kann.

Ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt weist eine oder mehrere Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und eine oder mehrere Bindungsstellen für ein CD30-Oberflächenprotein auf. Vorzugsweise weist das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt eine oder zwei Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und eine oder zwei Bindungsstellen für ein CD30-Oberflächenprotein auf.

Ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt kann durch verschiedene Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise kann ein  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, das eine Bindungsstelle für einen CD16-Rezeptor und eine Bindungsstelle für ein CD30-Oberflächenprotein aufweist, z.B. dadurch hergestellt werden, daß ein erstes einzelkettiges  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, das eine  $V_H$ -Domäne eines anti-CD16-Antikörpers und eine  $V_L$ -Domäne eines anti-CD30-Antikörpers aufweist, zusammen mit einem zweiten einzelkettigen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, das eine  $V_L$ -Domäne eines anti-CD16-Antikörpers und eine  $V_H$ -Domäne eines anti-CD30-Antikörpers aufweist, exprimiert wird, wodurch sich beide aneinanderlagern und das erfindungsgemäße  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt ausgebildet wird. Ergänzend wird auf die Beispiele 1-3 verwiesen.

Ferner kann ein  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, das zwei bis vier Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und zwei Bindungsstellen für ein CD30-Oberflächenprotein aufweist, z.B. dadurch hergestellt werden, daß ein einzelkettiges  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt exprimiert wird, das die Elemente (a) und (b) umfaßt:

- (a) eine  $V_H$ -Domäne eines anti-CD16-Antikörpers und eine  $V_L$ -Domäne eines anti-CD30-Antikörpers, wobei die Domänen über einen Peptidlinker 1 miteinander verbunden sind, der

jegliche Aminosäuren, insbesondere Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) und vorzugsweise 0 - 10 Aminosäuren umfassen kann,

5 (b) eine  $V_H$ -Domäne eines anti-CD30-Antikörpers und eine  $V_L$ -Domäne eines anti-CD16-Antikörpers, wobei die Domänen über vorstehenden Peptidlinker 1 miteinander verbunden sind,

10 wobei die Elemente (a) und (b) über einen Peptidlinker 2 miteinander verbunden sind, der jegliche Aminosäuren, insbesondere Glycin, Serin und Prolin und vorzugsweise 3 - 10 Aminosäuren und ganz besonders die Aminosäuresequenz GPGPS umfassen kann. Ergänzend wird auf die Patentanmeldung 198 19  
15 846.9 des Anmelders verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, die für ein vorstehendes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt kodiert. Ferner sind Expressionsvektoren, die eine solche DNA enthalten, ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugt wird der Expressionsvektor pKID16-30 von Fig. 1. Dieser wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 29. Juli 1999 unter DSM 12960 hinterlegt. Des Weiteren sind Zellen, die einen vorstehenden Expressionsvektor enthalten, ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

30 (a) ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, und/oder  
(b) einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor, sowie  
(c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel, Träger, Kontrollen und Marker.

35 Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bereit, das Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein aufweist. Dieses F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt lässt sich in großen Mengen und großer Reinheit herstellen. Auch weist es keine Teile auf, die zu unerwünschten Immunreaktionen bei Patienten führen können. Besonders kennzeichnet sich das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt dadurch, daß es NK-Zellen aktivieren und gegen CD30-Oberflächenproteine exprimierende Zellen, insbesondere Tumorzellen, ganz besonders Morbus Hodgkin- oder Reed-Sternberg Zellen, ausrichten kann, wodurch diese Zellen lysiert werden. Somit eignet sich die vorliegende Erfindung gegen Erkrankungen vorzugehen, bei denen CD30-Oberflächenproteine exprimierende Zellen eine Rolle spielen. Solche Erkrankungen sind z.B. Tumorerkrankungen, insbesondere Morbus Hodgkin.

**Kürze Beschreibung der Zeichnungen:**

Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pKID16-30. Dieser kodiert für zwei einzelkettige F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte, von denen das eine die V<sub>H</sub>-Domäne eines anti-CD16-Antikörpers und die V<sub>L</sub>-Domäne eines anti-CD30-Antikörpers und das andere die V<sub>H</sub>-Domäne eines anti-CD30-Antikörpers und die V<sub>L</sub>-Domäne eines anti-CD16-Antikörpers aufweist. Nach Expression der einzelkettigen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte lagern sich diese aneinander, wodurch ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt erhalten wird.

Fig. 2 zeigt eine FACS-Analyse der Bindung eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukttes an CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen und CD16<sup>+</sup> Granulocyten. Die Tumorzellen und die Granulocyten wurden jeweils mit 20 µg des erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukttes inkubiert. Die Bindung des F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukttes wurde mit dem anti-c-myc

Antikörper 9E10 und Fluorescein-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen alleine mit 9E10 und Fluorescein-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG inkubiert.

5

Fig. 3 zeigt die cytolytische Aktivität von in peripheren Blutlymphozyten (PBL-Zellen) enthaltenen NK-Zellen (Effektor) gegenüber CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hogdkin-Zellen (Zielzellen) bei unterschiedlichen Effektor-Zielzellen-Verhältnissen in einem 5h JAM-Test. Ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (•) wurde mit einer Konzentration von 1 µg/ml verabreicht. Als Kontrolle wurde bimAbHRS-3/A9 (▲) (mit einer Konzentration von 4 µg/ml verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurden das erfindungsgemäße F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt ohne NK-Zellen (○) und NK-Zellen alleine (□) verwendet.

10

15

Fig. 4 zeigt die Behandlung von SCID Mäusen, die Morbus Hodgkin-Xenotransplantate tragen, mit einem erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt. Die Mäuse wurden am Tag 0 i.v. mit 100 µg eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt zusammen mit NK-Zellen enthaltenden PBL-Zellen (•) bzw. ohne solche (○), mit 200 µl PBS (\*), mit 1 x 10<sup>7</sup> PBL-Zellen (□), bzw. mit einem Gemisch von 100 µg mAb HRS-3 und A9 zusammen mit PBL-Zellen (◊) behandelt. Tumor-Durchmesser wurden zweimal pro Woche gemessen und das Tumor-Volumen wurde mit folgender Formel berechnet: Volumen = d<sup>2</sup>x Dxπ/6, wobei d der kleinere und D der größere Tumor-Durchmesser ist.

20

30

**Beispiel 1: Konstruktion des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pKID16-30**

Die cDNA der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen eines anti-CD16-Antikörpers mAb A9 wurde einer PCR unterzogen. Hierfür wurden die folgenden Primer verwendet:

VH5', 5-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTC (G) CAGCTGCAGC (G) AG-3 (NcoI);  
 VH3', 5-CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTTGTTTT-3 (HindIII);  
 VL5', 5-AGAGACGCGTACAGGCTGTTGACTCAGG-3 (MluI);  
 VL3', 5-GACTGCGCCGCAGACTGGCTGGCC-3 (NotI).

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: Ein Zyklus; 5 min bei 94°C, 3 min bei 58°C und 2 min bei 72°C, gefolgt von 30 Zyklen; 80 sec bei 94°C, 80 sec bei 58°C und 2 min bei 72°C bzw. letzteres 10 min im letzten Zyklus. Die PCR-Produkte wurden Gel-gereinigt und in den Vektor pCR-Script SK(+) (Stratagene) zur Sequenzierung inseriert. Zur Expression wurde die V<sub>H</sub>-Domäne über NcoI/HindIII und die V<sub>L</sub>-Domäne über MluI/NotI in den Vektor pHOG21 inseriert.

Die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen eines anti-CD30-scF<sub>v</sub>-Fragmentes wurden einer PCR unterzogen. Hierfür wurden die folgenden Primer verwendet:

5-ATGACCATGATTACGCCAAGC-3  
 5-AGACAAGCTTGGGTGTTGTTGGCTGAGGAGACGG-3 (HindIII);  
 5-GGCGGATATCGAGCTCACTCAGTCTCC-3 (EcoRV)  
 5-TATAGCGGCCGCAGCATCAGCCGTTGATTCC-3 (NotI).

Die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen des anti-CD30-scF<sub>v</sub>-Fragmentes bzw. des anti-CD16-scF<sub>v</sub>-Fragmentes wurden in den Expressionsvektor pKID inseriert, wodurch der erfindungsgemäße Expressionsvektor pKID 16-30 erhalten wurde. Dieser kodiert für die einzelkettigen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte V<sub>H</sub> 16-V<sub>L</sub> 30 und V<sub>H</sub> 30-V<sub>L</sub> 16.

**Beispiel 2: Expression des erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes in Bakterien**

E.coli-X11 Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit dem Expressionsplasmid pKID16-30 transformiert worden waren,

wurden über Nacht in 2YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose bei 37°C gezüchtet. 1:20-Verdünnungen der über Nacht-Kulturen wurden als Kolbenkulturen in 2YT-Medium bei 38°C unter Schütteln mit 280 rpm gezüchtet. Bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 5 0,8 wurden die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2YT-Mediums, das 100 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 M zugesetzt und das Wachstum wurde 10 bei 21°C (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt wurde wie in Kipriyanov, S.M. et al., Protein Engineering 10, (1997), 445 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde es durch eine Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70 % Sättigung) eingeengt. Das 15 Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (30000 g, 4°C, 45 min) gewonnen und in 10 % des Anfangsvolumens von 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC) wurde wie in Kipriyanov, S.M. et al., J. Immunol. Methods 200, (1997), 69 20 beschrieben, durchgeführt. Das gereinigte F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt wurde gegen eine Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung dialysiert.

**Beispiel 3: Charakterisierung des erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes**

**(A) Durchflußcytometrie**

Zum Nachweis der Bindung eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes an CD16<sup>+</sup> Granulocyten und CD30<sup>+</sup> L540CY-Morbus Hodgkin-Zellen wurde eine FACScan (Beckton Dickinson)-Analyse 30 durchgeführt. Hierzu wurden 1 x 10<sup>6</sup>-Zellen zweimal in eiskaltem PBS-N (PBS, 0,05% NaN<sub>3</sub>) gewaschen und mit 100 µl des F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes von Beispiel 2 45 min auf Eis 35 inkubiert. Die Zellen wurden 5 min mit 1200 rpm bei 4°C pelletiert und mit 2 ml PBS-N gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS-N, das 10 µg/ml des an das c-myc bindenden

Antikörpers 9E10 (ICI Chemikalien) enthielt, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und wie vorstehend gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Fluorescein-markiertem Ziege-anti-Maus IgG (Gibco BRL; 1:100 verdünnt in PBS-N), resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-N waren die Zellen für die Analyse mit PBS-N, das 1 µg/ml Propidiumjodid (Sigma) enthielt, bereit. Hintergrund-Fluoreszenz wurde bestimmt, indem die Zellen mit dem Antikörper 9E10 und Fluorescein-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

Es zeigte sich, daß das erfindungsgemäße F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt sowohl CD16<sup>+</sup> Granulocyten als auch CD30<sup>+</sup> L540 CY Morbus Hodgkin-Zellen erkennt und an sie bindet.

#### (B) Cytotoxizitätstest

Zum Nachweis der Aktivität eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes NK-Zellen zu aktivieren, CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen zu lysieren wurde ein Cytotoxizitätstest entsprechend des in Matzinger, P., J. Immunol. Meth. 145 (1991), 185 beschriebenen JAM-Tests durchgeführt. In dem Cytotoxizitätstest wird die DNA-Fragmentierung bewertet. Zellen wurden mit [<sup>3</sup>H] Thymidin bis zu einer Endkonzentration von 2,5-5 µCi/ml für 4-6 h markiert. Die Zellen wurden pelletiert, einmal mit Kulturmedium gewaschen und auf 10<sup>4</sup> Zellen/Vertiefung einer 96-Lochplatte eingestellt. Nach Zugabe von Effektor-Zellen (NK Zellen enthaltende periphere Blutzellen "PBL-Zellen") in verschiedenen Verdünnungen wurde die 96. Lochplatte in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5 % CO<sub>2</sub> für 4 h inkubiert. Die Zellen und das Medium wurden auf Fiberglas-Filter gesaugt. Nach Waschen und Trocknen der Filter wurden sie in Plastik-Tüten überführt, die eine Szintillationsflüssigkeit enthielten und unter Verwendung eines Flüssig-Szintillations-Zählers (LKB) gezählt. Die gemessene Radioaktivität bezieht sich auf intakte DNA, da DNA aus toten Zellen in kleine Fragmente abgebaut ist, die nicht

von den Filtern festgehalten werden. Zur Bestimmung der Cytotoxizität, d.h. der Abtötung von Zellen, wurde die Standardformel für den JAM-Test verwendet: % spezifische Abtötung =  $(S-E)/S \cdot 100$ , wobei E = experimentell erhaltene DNA in Gegenwart von Effektor-Zellen (in cpm) und S = erhaltene DNA in Abwesenheit von Effektor-Zellen (spontan).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt NK-Zellen aktivieren kann, CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen zu lysieren, wobei die Lyse stärker ist als bei Verwendung von bimAbHRS-3/A9.

#### (C) Einfluß auf Tumoren von Mäusen

CD30<sup>+</sup> L540CY Hodgkin's Lymphome wurden in SCID Mäusen, wie in Hombach, A. et al., Int. J. Cancer 55, (1993), 830; Renner, C. et al., J. Hematology 4, (1995), 447 beschrieben, etabliert. Hierzu wurden  $1.5 \times 10^7$  Tumorzellen in 200 $\mu$ l PBS subcutan in die rechte Flanke der Mäuse injiziert. Die Tumor-Entwicklung, d.h. der Tumor-Durchmesser, wurde zweimal pro Woche bestimmt. Mäuse mit Tumoren von 4-6 mm im Durchmesser wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt und erhielten ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt in 200 $\mu$ l PBS zusammen mit NK-Zellen enthaltenden peripheren Blutlymphozyten (PBL-Zellen). Das Tumorvolumen und seine Entwicklung wurden bestimmt (vgl. Legende zu Fig. 4).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nicht nur in vitro sondern auch in vivo NK-Zellen aktivieren kann, CD30<sup>+</sup> L540CY Morbus Hodgkin-Zellen zu lysieren.

**Patentansprüche**

5        1.  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-Oberflächenprotein.

10      2.  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei der CD16-Rezeptor von NK-Zellen stammt.

15      3.  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, wobei das CD30-Oberflächenprotein von Morbus Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen stammt.

15      4.  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 - 3, wobei jeweils eine Bindungsstelle vorliegt.

20      5.  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, kodiert durch den Expressionsvektor pKID16-30 (DSM 12960).

20      6.  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei jeweils zwei Bindungsstellen vorliegen.

25      7. Expressionsvektor, kodierend für das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 - 6.

25      8. Expressionsvektor nach Anspruch 7, nämlich pKID16-30 (DSM 12960).

30      9. Transformante, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 7 oder 8.

35      10. Verfahren zur Herstellung des  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt des nach einem der Ansprüche 1-6, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 9 unter geeigneten Bedingungen.

11. Kit, umfassend:

(a) ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt,

und/oder

- 5            (b) einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor, sowie  
              (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel,  
              Träger, Kontrollen und Marker,

wobei von den einzelnen Komponenten ein oder mehrere  
Vertreter vorliegen können.

10          12. Verwendung des F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der  
              Ansprüche 1-6 zur Lyse von CD30-Oberflächenproteinen  
              exprimierenden Zellen.

15          13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Zellen Tumorzellen  
              sind.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Tumorzellen Morbus  
              Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen sind.

**F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte**

Die vorliegende Erfindung betrifft F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte mit  
5 Bindungsstellen für einen CD16-Rezeptor und ein CD30-  
Oberflächenprotein, wobei sich die F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte  
eignen, eine Regression von Morbus Hodgkin zu induzieren.  
Ferner - betrifft die Erfindung für solche F<sub>v</sub>-Antikörper-  
Konstrukte kodierende DNAs sowie ein Verfahren zur Herstellung  
10 der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte und ihre Verwendung.

Asel

1 CTCGAGAGCGGGCAGTGAG AACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCAT GCACCCAGGCTTACACTTAT  
 79 GCTCCGGCTCGTATGTTGAGGAATTGTGAGCGGATAACAATTACACAGAATTCACTAAAGAGGAGAAATTAAC  
 PeiB leader AlwNI EcoRI RBS  
 157 CATGAAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGGCAGCTCAGCCGCCATGGCCAGGTGCAGCTG  
 1> MetAlaGlnValGlnLeu

VH anti-CD16 EcoRV

235 CAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCCTGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTCACT  
 7> GlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGlyThrSerValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThr  
 CDR-H1 EcoRV CDR-H2  
 313 AACTACTGGCTAGGTTGGGTAAAAACAGAGGCCCTGGACATGGACTCGAGTGGATTGGACATATCTACCCCTGGAGGTGGT  
 33> AsnTyrTrpLeuGlyTrpValLysGlnArgProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGlyAspIleTyrProGlyGlyGly  
 391 TATACTAACTACAATGAGAAATTCAAGGCCAACAGTGA  
 59> CTGAGACACATCCTCCAGAACTGCCTACGTGCAG  
 59> TyrThrAsnTyrAsnGluLysPheLysGlyLysAlaThrValThrAlaAspThrSerArgThrAlaTyrValGln  
 CDR-H3

469 GTCAGGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTCTGCAAGATCGGCTAGCTGGTACTTCGATGTCCTGGGC  
 85> ValArgSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAlaArgSerAlaSerTrpTyrPheAspValTrpGly  
 CH1 HindIII Linker EcoRV

547 GCACGGACTACGGTCACCGCTCCTCAGCCAAAACACCCAAGCTTGGCGGTGATATCGAGCTCACTCAGTCTCCA  
 111> AlaArgThrThrValThrValSerSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAsp IleGluLeuThrGlnSerPro

VL anti-CD30

5 AAATTCAATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAACGTCACCTACAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCC  
 7> LysPheMetSerThrSerValGlyAspArgValAsnValThrTyrLysAlaSerGlnAsnValGlyThrAsnValAla  
 703 TGGTTTCAACAAAACCAGGGCAATCTCTAAAGTTCTGATTTACTCGGCATCTTACCGATACAGTGGAGTCCCTGAT  
 163> TrpPheGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysValLeuIleTyrSerAlaSerTyrArgTyrSerGlyValProAsp  
 781 CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTAT  
 189> ArgPheThrGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerAsnValGlnSerGluAspLeuAlaGluTyr  
 C kappa NotI

859 TTCTGTCAGCAATATCACACCTATCCTCACGTTGGAGGGGGCACCAAGCTGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCG  
 215> PheCysGlnGlnTyrHisThrTyrProLeuThrPheGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla  
 BamHI c-myc epitope His6 tail BgIII

937 GCCGCTGGATCCGAAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCACATCACCACATCAAAGATCTATT  
 241> AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis

RBS Pei B leader NcoI

1015 AAAGAGGAGAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCC  
 NcoI Serum A VH anti-CD30

1093 ATGGCGGCCATGGCCCAGGTGCAACTGCACTGCACTGGGGCTGAGCTGGCTAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC  
 1> MetAlaGlnValGlnLeuGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer  
 1171 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTACACTACAAATACACTGGTAAGACAGAGGCCCTGGACATCTGGAATGG  
 24> CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrThrIleHisTrpValArgGlnArgProGlyHisAspLeuGluTrp  
 9 ATTGGATACTTAATCCTAGCAGTGGATATTCTGACTACAATCAGAACCTCAAGGGCAAGACACATTGACTGCAGAC  
 0> IleGlyTyrIleAsnProSerSerGlyTyrSerAspTyrAsnGlnAsnPheLysGlyLysThrThrLeuThrAlaAsp  
 1327 AAGTCCTCAACACAGCCTACATGCAACTGAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGA  
 76> LysSerSerAsnThrAlaTyrMetGlnLeuAsnSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgArg  
 CH1

1405 GCGGACTATGGTAACTACGAATATACTGGTTGCTACTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA  
 102> AlaAspTyrGlyAsnTyrGluTyrThrTrpPheAlaTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerAlaLys  
 HindIII Linker EcoRV VL anti-CD16

1483 ACAACACCCAAGCTGGGGTGTATCCAGGCTGTTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTAAAC  
 128> ThrThrProLysLeuGlyAspIleGlnAlaValValThrGlnGluSerAlaLeuThrThrSerProGlyGluTh

CDR-L1

1560 AGTCACACTCACTTGTGCTCAAATACTGGACTGTTACAACACTGAACTATGCCAAGTGGTCCAAGAAAAACCAGA  
 153> rValThrLeuThrCysArgSerAsnThrGlyThrValThrSerAsnTyrAlaAsnTrpValGlnGluLysProAs  
 CDR-L2

1638 TCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTCAACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGAT  
 179> pHisLeuPheThrGlyLeuIleGlyHisThrAsnAsnArgAlaProGlyValProAlaArgPheSerGlySerLeuI  
 CDR-L3

1716 TGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTCTGCTCTATGGTATAA  
 205> eGlyAspLysAlaAlaLeuThrIleThrGlyAlaGlnThrGluAspGluAlaIleTyrPheCysAlaLeuTrpTyrAs

NotI BamHI

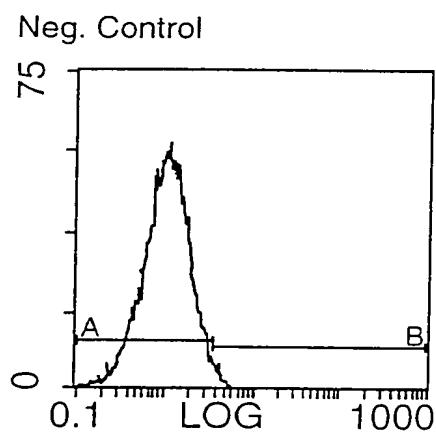
1794 CAACCATGGGTGTTGGTGGAGGAACCAAACGACTGACTGTCTAGGCCAGCCAAGTCTGCGGCCGCTGGATCCGAACA  
 231> nAsnHisTrpValPheGlyGlyThrLysLeuThrValLeuGlyGlnProLysSerAlaAlaGlySerGluG1

c-myc epitope His6 tail XbaI BclI NheI  
 1872 AAAGCTGATCTCAGA [ ] GACCTAAACTCACATCA[ ] CACATCA[ ] CACCATCA[ ] ATCTAGAGGCCCTGTGCTAATGATCAGC  
 257 nLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis  
 1950 TAGCTTGGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTCGTTTATCTGTTGTTGTCGGTTAAC HpaI  
 Sall Earl Pvul FspI BglI  
 2028 GTCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATGCCCTCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGCCGAATGGGA  
 2106 CGGCCCTGTAGCGGCCATTAGCGGGGGTGTGGTGGTACGCGCAGCGTACACTTGCCAGGCCCT  
 2184 AGCGCCCCTTCGCTTCTCCCTTCGCCACGTTGCCGGCTTCCCCGTCAGCTCTAAATCGGG f1 IR DralII  
 2262 GCTCCCTTAGGGTCCGATTAGCTTACGGCACCTCGACCCAAAAACTGATTAGGGTATGGTTACGTAG  
 2340 TGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTCCA  
 2418 AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTCGCCGATTGCCCTATTGGTT SspI  
 2496 AAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTAAACGGAATTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTAGGTGGCACTTTT BspHI  
 2574 CGGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA  
 SspI Earl  
 2652 CCTGATAAAATGCTTCATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGCGCCCTATTCCCTT ApaI  
 2730 TTTGCCGCATTTGCCCTCTGTTTGCTACCCAGAACCGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGT XmnI  
 28 GCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAAGAACGTTCCA Dral  
 2886 ATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTTGGCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGC Scal 1000  
 2964 CGCATAACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTA  
 **$\beta$ -Lactamase** Pvul  
 3042 AGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG FspI  
 3120 AAGGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACCTGCCCTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAA Asel  
 3198 GCCATACCAAACGACGAGCGTGAACACCACGATGCCGTAGCAATGGCAACACGTTGCCAAACTATTAACTGGCGAA BglII  
 3276 CTACTTACTCTAGCTCCGCCAACATTAAATAGACTGGATGGAGGCCGATAAAGTTGCAGGACCACTCTGCGCTCG BsaI  
 3354 GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGGCTCGCGGTATCATTGCAAGCAGCAGCTG  
 3432 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTACGTTATCTACACCGACGGGGAGTCAGGAAACTATGGATGAACGAAATAGA 3510 CAGATCGCTGAGATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATAACTTAGATT Dral  
 38 GATTTAAAACCTCATTTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAA BspHI  
 5 CGTGAGTTTCGTTCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTTGAGATCCTTTTCTGCGC  
 44 GTAATCTGCTGCTTCAAAACAAAAACCCGCTACCGCGGTGGTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT 3822 TTTCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGACCGCAGATACCAAATACTGTCCTCTAGGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC AlwNI  
 3900 TTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG CoIE1 2000 ApaI  
 3978 TCGTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCCAGCGGTGGCTGAACGGGGGGTCGTGC  
 4056 ACACAGCCCGAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACGAGATACCTACAGCGTGGCTATGAGAAAGGCCACGCTT  
 4134 CCCGAAGGGAGAAAGGCGCACAGGTATCCGTAAGGGCAGGGTGGAAACAGGAGAGCGCACGGAGCTTCCAGGG  
 4212 GGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTCCTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTGTTGATGCTCGTCA  
 4290 GGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCGGCTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCAC  
 4368 ATGTTCTTCCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCG Earl  
 4446 AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAAATACGCAAACCGCCTCTCCCCCG Asel BspMI  
 4524 CGTTGGCCGATTCAATTAAATGCAAGGTATCACGAGGCCCTTTCGTCCTCAC

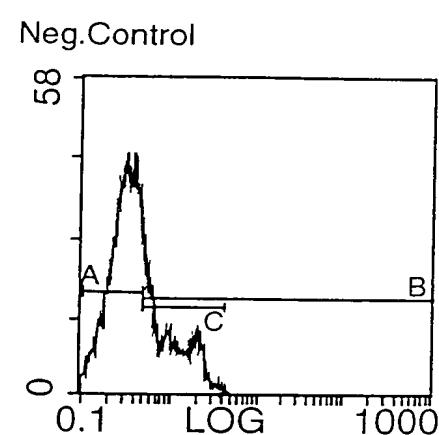
Fig. 1 (Fortsetzung)

**Fig. 2**

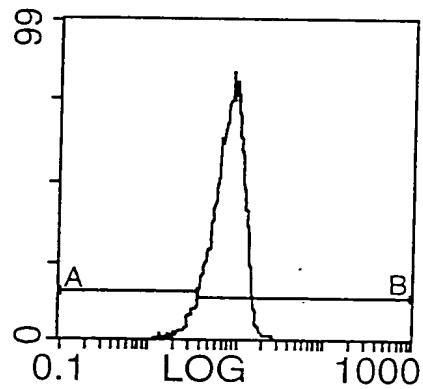
Granulocytes (CD16<sup>+</sup>)



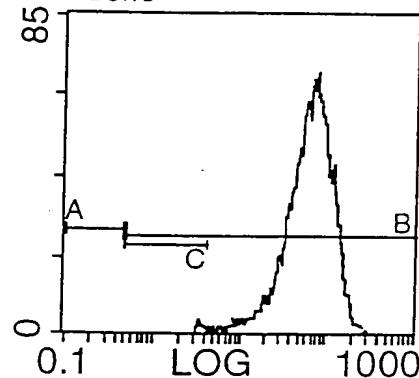
L540CY cells (CD30<sup>+</sup>)



erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt



erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt



Fluorescence Intensity

**Fig. 3**

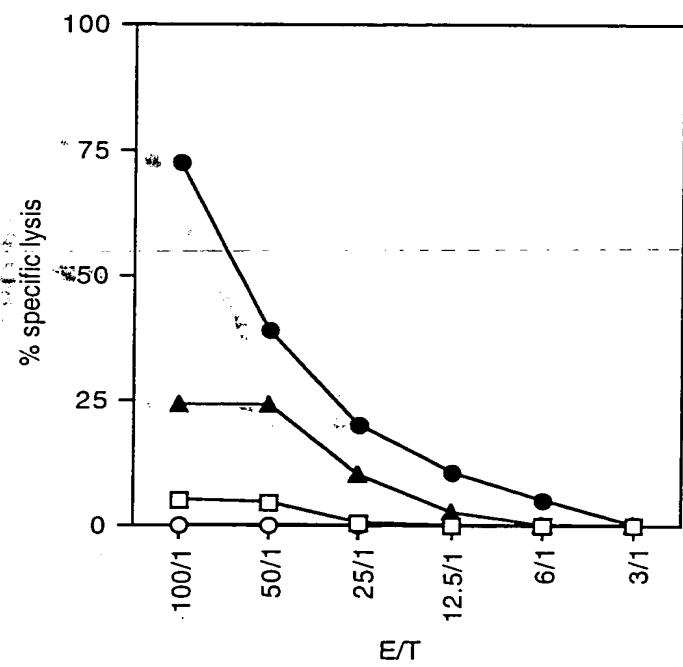
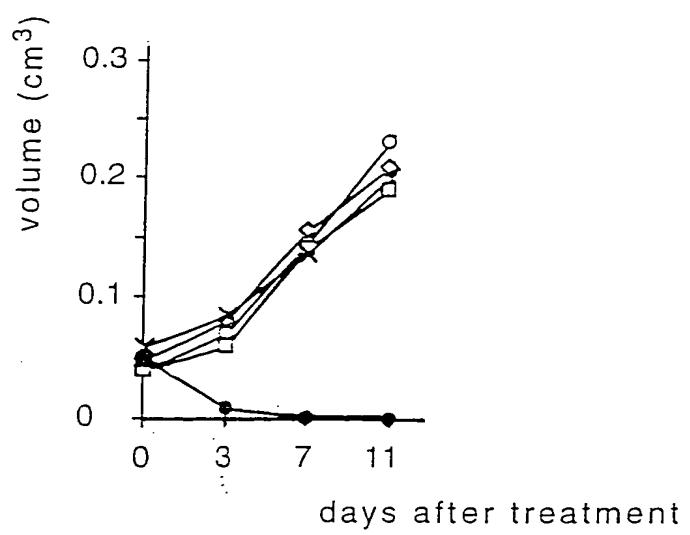


Fig. 4



This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)